

10/523572
Rec'd PCT 28 JAN 2005

PCT/JP03/09795

01.08.03

REC'D 19 SEP 2003

WIPO PCT

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月 2日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-226277
[ST. 10/C]: [JP2002-226277]

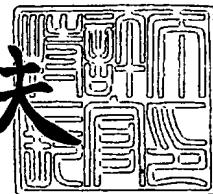
出 願 人
Applicant(s): 角田 愛美

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3072218

Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1071

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61M 1/02

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区下馬 3-20-10

 【氏名】 角田 愛美

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県金沢区長浜 2-23-2

 【氏名】 春日井 昇平

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都中野区上高田 5-5-2-501

 【氏名】 秋吉 一成

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都多摩市桜ヶ丘 4-32-7

 【氏名】 岩崎 泰彦

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区下馬 3-20-10

 【氏名又は名称】 角田 愛美

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 067070

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 赤血球沈降方式より得た血小板多血漿および血小板多血漿の調製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 採血して得られた全血の赤血球を選択促進的に凝集沈降させる工程を含むことを特徴とする血小板多血漿の調製方法。

【請求項 2】 赤血球を選択促進的に凝集沈降させる方法が、有機酸および／またはアミノ酸もしくはその誘導体を添加することである請求項 1 に記載の調製方法。

【請求項 3】 アミノ酸もしくはその誘導体が、酸性アミノ酸からなる請求項 2 に記載の調製方法。

【請求項 4】 アミノ酸誘導体がポリアミノ酸である請求項 2 または 3 に記載の調製方法。

【請求項 5】 ポリアミノ酸がポリ-L-グルタミン酸である請求項 4 に記載の調製方法。

【請求項 6】 アミノ酸の添加量が、血液量に対して 0.1~0.3w/v% である請求項 2~5 のいずれか 1 に記載の調製方法。

【請求項 7】 請求項 1~6 のいずれか 1 の方法で得られた血小板多血漿。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、医療の分野で使用される血小板多血漿(platelet-rich plasma)およびその調製方法に関する。

【0002】

【従来技術】

現在、失われた組織の再生の分野において、医学、工学はますます進歩を遂げている。

しかし、近年、医療用として使われている血液製剤や、動物（特に牛）から作製された生理的活性物質を使用することで、それらに混入するウイルス、プリオ

ン等による感染により、安全を脅かされる事件が多数おこっており、社会的問題となっている。このようなことから、医療すべてに対する安全性について、非常に関心が高まっている。

また、日常の臨床応用の場においては、安全というだけでなく、その操作が確実、簡便なこともまた、重要なことである。

【0003】

こういった背景から、以前から術後の止血、創傷治癒促進剤として効果が認められてきたフィブリン製剤から発展させ、自己の血液成分を用いて、創傷治癒を早めるという治療方法が脚光を浴びるようになってきた。例えば、活性化された血小板は、創傷治癒早期において、細胞の遊走、分化を誘導する物質を分泌するため、手術の前に、自己の血液より血小板を濃縮した血漿（血小板多血漿：platelet-rich plasma）を作っておき、術部に血小板を活性化させたPRPを塗布して、治癒の促進を図ろうというものである。多数の臨床家によって、この方法による創傷治癒の促進が図られたという報告がなされるようになった。

【0004】

しかしながら、自己の血液を使うという非常に安全な方法の上に、ある程度の確実な成績が得られる。しかしその操作法の複雑さ、危険性、手間、熟練した人手を必要とすること、高価な器具の購入、保守経費の増大等の問題点がある。

【0005】

臨床検査に使用する血小板多血漿は、前腕正中静脈より採血し、3.1w/v%クエン酸ナトリウムを1.5mL含むプラスチックチューブに全血を4.5mLずつ加え、転倒混和したものを50g15分間22℃で遠心した上清により得られる（臨床検査法提要第31版第400頁）。しかし、従来の遠心分離法によると、操作が煩雑であり、赤血球を沈降させることができて、全血中に含まれる白血球などの血液成分やフィブリノゲン等の成分も遠心分離されてしまう。以下、便宜上従来法によって得られた血小板多血漿を「PRP」とよび、本発明の血小板多血漿と区別する。

【0006】

術後の止血、創傷治癒促進剤として使用する血小板多血漿は、血小板成分のみ

ならず、フィブリノゲンを多く含む血漿成分や白血球を含めた血液成分を含むことが望ましく、このような活性の高い血小板多血漿が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、活性の高い血小板多血漿を容易にかつ安価に提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、鋭意検討を重ねた結果、ポリ-L-グルタミン酸を全血に添加すると、選択促進的に赤血球を凝集沈降させることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、

1. 採血して得られた全血の赤血球を選択促進的に凝集沈降させる工程を含むことを特徴とする血小板多血漿の調製方法、
2. 選択促進的に赤血球を凝集沈降させる方法が、有機酸および／またはアミノ酸もしくはその誘導体を添加することである前項1に記載の調製方法、
3. アミノ酸もしくはその誘導体が、酸性アミノ酸からなる前項2に記載の調製方法、
4. アミノ酸誘導体がポリアミノ酸である前項1または2に記載の調製方法、
5. ポリアミノ酸がポリ-L-グルタミン酸である前項4に記載の調製方法、
6. アミノ酸の添加量が、血液量に対して0.1~0.3w/v%である前項2~5のいずれか1に記載の調製方法、
7. 前項1~6のいずれか1の方法で得られた血小板多血漿、からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明において、血小板多血漿には、血小板のみならず、フィブリノゲンを多く含む血漿成分を含むことが望ましく、また白血球を含めた血液成分を含んでも良い。血小板は損傷した内皮下組織に粘着・凝集して血栓を形成し、止血に

際して、また、他の細胞を遊走、分化誘導する物質の貯蔵、放出に関して、非常に重要な役割を果たしている。フィブリンは、血漿中のフィブリノゲンに酵素トロンビンが作用して生じるもので、血液凝固の最終段階に関わるものである。さらに、細胞分化の足場としても重要である。また、白血球は細菌や有害な微生物などの侵入を防ぐ働きをもつ免疫機能や殺菌機能を有する血液細胞の1つである。

【0011】

本発明の血小板のみならず、血漿成分や白血球等の血液成分を含む血小板多血漿を得るためには、全血から選択促進的に赤血球を凝集沈降させることができれば良い。赤血球が凝集沈降した状態を赤沈ともいう。

【0012】

本発明に使用する全血は通常採血する方法に従って取得すればよい。また、採血した全血はそのままでは凝固してしまうため、採血後抗凝固剤を予め加えておくことが望ましい。抗凝固剤としては、通常使用されているものであって、生体に対して毒性を示さないものであれば良い。例えば、クエン酸ナトリウムなどが一般的に使用される。

【0013】

全血から選択促進的に赤血球を凝集沈降させるために、有機酸および／またはアミノ酸もしくはその誘導体、好ましくは酸性アミノ酸もしくはその誘導体、より好ましくはポリアミノ酸、さらに好ましくはポリ-L-グルタミン酸を全血に添加することができる。添加するポリアミノ酸は分子量が大きい方が赤沈を促進する。具体的には、分子量が約1万以上であることが望ましい。

【0014】

ポリアミノ酸は、抗凝固剤を含む血液量1.5mLに対して2~4mg、好ましくは2.5~4mg添加することができる。換算すると、0.1~0.3w/v%、好ましくは0.15~0.3w/v%である。

【0015】

ポリアミノ酸を添加し、静置しておくことにより赤沈が認められ、上清の血小板多血漿を得ることができる。赤沈は、早ければ測定後10分程度で認められ、

20分から30分程度で、目的の血小板多血漿を得ることができる。

【0016】

本発明は、上記方法によって調製された血小板多血漿にもおよぶ。

【0017】

【実施例】

以下、本発明を実施例および実験例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0018】

【実施例1】

本実施例は、全血（末梢血）へのポリ-L-グルタミン酸（分子量21,270）の添加による赤沈への影響と、その上清中の細胞数の計測、微分干渉顕微鏡による細胞の形態観察を目的とする。

【0019】

（材料と方法）

赤沈速度の差を比べるために、次の方法で4種の試料を調製した。抗凝固剤としてのクエン酸ナトリウム溶液は、3.13w/v%となるように調製した。

試料1：血液1.5mLに、2mgのポリ-L-グルタミン酸を添加する。

試料2：クエン酸ナトリウム溶液0.15mLに血液を1.35mL加え、全体を1.5mLとしたものに、2mgのポリ-L-グルタミン酸を添加する。

試料3：クエン酸ナトリウム溶液0.15mLに血液を1.35mL加え、全体を1.5mLとする。

試料4：リン酸緩衝液（PBS）1.5mLに、2mgのポリ-L-グルタミン酸を添加する。

【0020】

（結果）

1) 赤沈について

上記各試料を30分間静置したのちの赤沈の状況は次のとおりである。

試料1では赤沈観察の途中で血液凝固してしまい、赤沈は認められなかった。

試料3にくらべ、試料2はポリ-L-グルタミン酸を混入することによって、赤沈

が促進された。

【0021】

2) 血小板数

上記各試料を30分間静置したのちの上清に含まれる血小板数を日本光電株式会社製全自動血球測定器Celltac α (MEC-6318)により計測した。各試料の上清における血小板数 ($10^4/\mu\text{l}$) を表1に示した。

【0022】

【表1】

	全血 (末梢血)	試料1	試料2	試料3
血小板数	19.5	1	31.7	12.8

【0023】

3) 顕微鏡観察について (図1～図5)

各試料の上清部分を落射蛍光、微分干渉顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E600) にて観察し、写真撮影した。

図1は、末梢血を示し、図2は試料3の上清部分を示す倍率1000倍での微分干渉顕微鏡写真を模式的に示した図である。この顕微鏡観察により、大きさ、色および形態から赤血球、白血球および血小板が比較的容易に分類できた。

図3は、試料2にて得られた上清の像の模式図である。図1に比べ、赤血球が少なく、血小板および白血球が多く観察された。

図4は血液凝固がみられた試料1の上清の像の模式図であるが、血小板は全く認められなかった。

図5は、試料4の像の模式図であるが、何も認められなかった。

これらの結果より、抗凝固剤を含む全血にポリ-L-グルタミン酸を混入することで、赤沈の上清に血小板を多く含む血球成分が存在することが示唆された。

【0024】

【実施例2】

本実施例は、添加するポリ-L-グルタミン酸 (分子量21,270) について、同じ

分子量であるが添加量を変えた場合の赤沈への影響調べることを目的とする。

【0025】

(材料と方法)

次の方法で5種の試料を調製した。抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム3.13w/v%を混入した水溶液0.15mLに血液を1.35mL加え全体を1.5mLとしたものを全血試料とした。各全血試料に各重量のポリ-L-グルタミン酸を添加した。

試料1: ポリ-L-グルタミン酸 1mg

試料2: ポリ-L-グルタミン酸 2mg

試料3: ポリ-L-グルタミン酸 2.5mg

試料4: ポリ-L-グルタミン酸 3mg

試料5: ポリ-L-グルタミン酸 4mg

【0026】

(結果)

1) 赤沈について

上記各試料を30分間静置したのちの赤沈は、ポリ-L-グルタミン酸を3mg添加した場合に最も効果的に認められた。その場合の上清の量は0.8mLであった。

【0027】

2) 血小板数

上記各試料を30分間静置したのちの上清に含まれる血小板数を実施例1と同様に計測した。全血試料(末梢血)の血小板数は $19.7 (10^4 / \mu l)$ であったのに対し、各試料の上清における血小板数は $34.5 (10^4 / \mu l)$ から $37.0 (10^4 / \mu l)$ と約2倍に増加した。

【0028】

【実施例3】

(目的)

本実施例は、分子量の異なるポリ-L-グルタミン酸を用いた場合の赤沈および血球数に及ぼす効果を調べることを目的とする。

【0029】

(材料と方法)

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム3.8w/v%を混入した水溶液0.15mLに血液を1.35mL加え全体を1.5mLとしたものを全血試料とした。これに分子量の異なるポリ-L-グルタミン酸を各々3mg添加し、5種の試料を調製した。上記各試料を30分間静置した場合の赤沈の差を比較した。

試料1: ポリ-L-グルタミン酸 無添加 (コントロール)

試料2: ポリ-L-グルタミン酸 分子量 5,800 (Lot.40K1650)

試料3: ポリ-L-グルタミン酸 分子量 17,500 (Lot.128H5903)

試料4: ポリ-L-グルタミン酸 分子量 21,270 (Lot.11K5114)

試料5: ポリ-L-グルタミン酸 分子量 42,000 (Lot.27H5535)

【0030】

(結果)

1) 赤沈

赤沈の様子を観察した結果、ポリ-L-グルタミン酸の分子量が大きい方が赤沈を速く認めた。

【0031】

2) 血球測定

上清の血小板の濃度は、試料4および試料5を比べたところ、分子量の大きい試料5の方が高かった。

【0032】

【表2】

	血小板 ($10^4/\mu\text{l}$)	白血球 ($10^2/\mu\text{l}$)	赤血球 ($10^4/\mu\text{l}$)
コントロール(血液)*	20.7	69	424
コントロール(上清)**	45.1	118	26
試料2	44.6	141	6
試料3	47.5	147	3
試料4	37.0	90	3
試料5	38.6	77	2

* 末梢血

** 末梢血の赤沈後の上清

【実験例1】

(目的)

本実験例は、赤沈法により得られた血小板多血漿中の血小板の活性能を調べる事を目的とする。活性能（凝集能）が高い血小板は凝集し、フィブリン塊とともに沈降するので、そのような血小板を含む試料は透過率が大きい。この原理を利用し、血小板活性能の計測を行う。

【0033】

(材料と方法)

赤沈法によって得られた血小板多血漿390 μ Lに塩化カルシウムを10 μ L (12.21 g/L)、ADPを40 μ L (0.2mmol) 添加したものを測定用試料とした。該赤沈法によって採取される上清を、分光光度計 (MCM HEMA TRACER 212 (MCMEDICAL)) にて波長690nmにおける透過率を測定した。

【0034】

(結果)

赤沈法によって採取される上清は、白血球、血小板等を多く含むみ、かなり懸濁しているため、この上清を142G (1200rpm) で10分間遠心し、血球成分を沈降させた上層部を基準透過率 (100%) とした。

塩化カルシウム、ADPを添加して30分静置後に上清部の透過率は100%に達し、赤沈法で得られた血小板は、高い活性を保持していることが明らかになった。

【0035】

【実験例2】

(目的)

本実験例は、赤沈にて得られた上清中のフィブリノゲン量を測定することを目的とする。細胞遊走時の足場となるフィブリンの前駆体フィブリノゲンの存在は非常に大切である。赤沈法、遠心法によって作製された試料中のフィブリノゲン量を測定した。

【0036】

(材料と方法)

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム3.8w/v%を混入した水溶液0.15mLに全血を

1. 35mL加え全体を1.5mLとしたものを出発原料とする。

ここで赤沈法とは、出発原料にポリ-L-グルタミン酸 (3mg) を添加し、30分間静置することをいう。以下の実験例についても同様である。

試料1：赤沈法により採取した上清

試料2：出発原料を1回遠心した後の血漿上層（乏血小板血漿：PPP）

（遠心条件：1000G×10分）

試料3：出発原料を2回遠心した後の血漿（多血小板血漿：PRP）

（遠心条件：1000G×10分および700G×8分）

各試料を0.5mL採取し、光散乱法の測定方法によりフィブリノゲン量の測定を行った。

【0037】

（結果）

その結果、試料1で222mg/dL、試料2のPPPで252mg/dL、試料3のPRPで178mg/dLのフィブリノゲンが測定された。この結果より、赤沈法により得られた上清（血小板多血漿）中のフィブリノゲン量は、従来の遠心法により作製されたPRP中のそれよりも多いということが判明した。

【0038】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の血小板多血漿の調製方法により、活性の高い血小板多血漿を、遠心分離の処理をすることなく容易にかつ安価に提供することができる。特に、自己の血液成分を原料として本発明の方法により得られた血小板多血漿が、術後の止血、創傷治癒促進剤として医療の現場で活用されうる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

末梢血の微分干渉顕微鏡写真の模式図である。（実施例1）

【図2】

末梢血上清の微分干渉顕微鏡写真の模式図である。（実施例1）

【図3】

試料2にて得られた上清の像の模式図である。（実施例1）

【図 4】

血液凝固がみられた試料 1 の上清の像の模式図である。(実施例 1)

【図 5】

試料 4 の像の模式図である。(実施例 1)

【符号の説明】

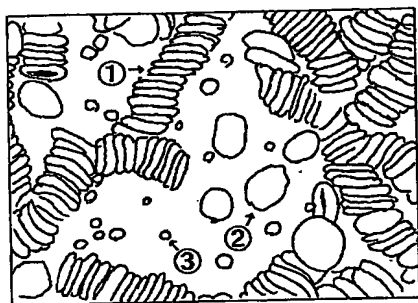
- ① 赤血球
- ② 白血球
- ③ 血小板

【書類名】 図面

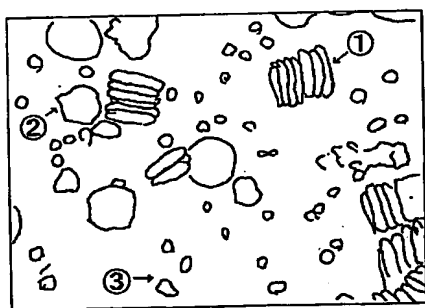
【図1】



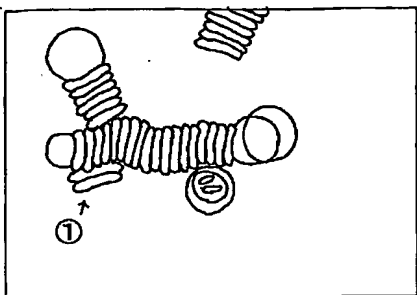
【図2】



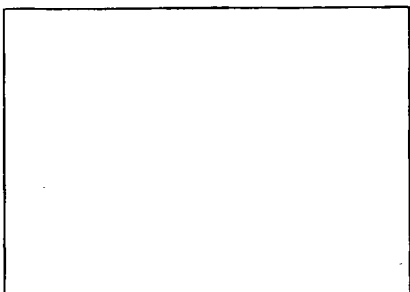
【図3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、活性の高い血小板多血漿を容易にかつ安価に提供することである。

【解決手段】 採血して得られた全血を、遠心分離によらず、選択促進的に赤血球を凝集沈降させることによる。例えば、ポリ-L-グルタミン酸を全血に添加し、一定時間静置させると選択促進的に赤血球を凝集沈降させることができ、上清には血小板の他、フィブリノゲンを多く含む血漿成分や白血球を含めた血液成分を含む活性の高い血小板多血漿を得ることができる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-226277
受付番号	50201150315
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0093
作成日	平成14年 8月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 8月 2日

次頁無

出証特 2003-3072218

【書類名】 手続補正書（方式）
【整理番号】 NP02-1071
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-226277
【補正をする者】
【識別番号】 502281493
【氏名又は名称】 角田 愛美
【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】
【氏名又は名称】 庄司 隆
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区下馬 3-20-10
【氏名】 角田 愛美
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区長浜 2-23-2
【氏名】 春日井 昇平
【発明者】
【住所又は居所】 東京都中野区上高田 5-5-2-501
【氏名】 秋吉 一成
【発明者】
【住所又は居所】 東京都多摩市桜ヶ丘 4-32-7
【氏名】 岩崎 泰彦
【その他】 発明者・春日井昇平および岩崎泰彦の住所にタイプミスがありましたので、春日井昇平の住所に「横浜市」を加筆訂正し、岩崎泰彦の住所「桜ヶ丘四」とあるところを「桜ヶ丘」に訂正いたします。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-226277
受付番号	50301248496
書類名	手続補正書(方式)
担当官	森谷 俊彦 7597
作成日	平成15年 7月31日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 7月28日

特願2002-226277

出願人履歴情報

識別番号

[502281493]

1. 変更年月日

2002年 8月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区下馬3-20-10

氏 名

角田 愛美

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.